

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 53–56, Januar 1971

Kombinierte elektrophoretische Darstellung von Proteinen und Kohlenhydraten auf einem Streifen

Von J. BARROLLIER und V. BUSSE

*Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut und der Chirurgischen Universitätsklinik
— Klinikum Westend — der Freien Universität Berlin*

(Eingegangen am 13. August 1970)

Es wird eine Methode beschrieben, Proteine und Glykoproteine nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Streifen anzufärben. Mit Tartrazin für die Proteinfärbung und rosanilinschwefliger Säure für die Kohlenhydratfärbung wurden Farbstoffe gewählt, deren Absorptionsmaxima so weit auseinander liegen, daß bei der Messung des einen die Absorption des anderen Farbstoffs praktisch zu vernachlässigen war. Eine exakte Zuordnung dieser beiden Serumbestandteile zueinander ist so möglich. Bei der Anwendung der Methode im klinisch-chemischen Laboratorium konnten Besonderheiten im Verhalten von Proteinen zu Glykoproteinen bei Paraproteinämien (Plasmocytom und M. WALDENSTRÖM) aufgezeigt werden.

The combined electrophoretic separation of proteins and carbohydrates on one strip

A method is described for the location of both proteins and glycoproteins on the same electrophoresis strip. Using tartrazine for the protein and rosaniline-sulphurous acid for the carbohydrate, colours are obtained with widely different absorption maxima, so that each may be measured with practically no interference by the other. Each serum component can therefore be exactly identified. In the clinical chemical laboratory, the method revealed peculiarities in the ratio of proteins to glycoproteins in paraproteinemias (plasmacytoma and M. WALDENSTRÖM).

Seit den Untersuchungen von MÖRNER (1) konnte gezeigt werden, daß Kohlenhydrate Bestandteil der Serumproteine sind. Im folgenden wurden dann diese Kohlenhydrate in den Serumfraktionen von RIMINGTON (2) und SÖRENSEN (3) durch Fällungsmethoden analysiert. Die ersten elektrophoretischen Untersuchungsmethoden stammen von TISELIUS (4), KÖIW und GRÖNVALL (5) und WUNDERLY und PILLER (6).

Es handelt sich dabei um jene eiweißgebundenen Kohlenhydrate, die im Unterschied zu den Mukopolysacchariden bei der sauren Eiweißfällung mit Trichloroessigsäure ausfallen, also die eigentlichen Glykoproteine. Sie enthalten nur 1–5% Zucker in Form von Mannose, Hexosamin, Galaktose und wechselnden Mengen von Sialinsäure und Neuraminsäure.

Eine genaue quantitative Aussage über die Beziehung Glykoprotein—Serumprotein ist durch den stark wechselnden Anteil verschiedener Zucker mit ihren unterschiedlichen Farbstoffbindungen nicht möglich. Relative Unterschiede der Kohlenhydrat-Mengen in den Eiweißfraktionen lassen sich aber sehr gut erkennen.

In dieser Arbeit soll erstmals eine Methode beschrieben werden, die eine einwandfreie Bestimmung von Kohlenhydraten und Proteinen auf einem Elektrophoresestreifen ermöglicht. Bei den bisher geübten Verfahren (WUNDERLY und Mitarbeiter) (6) war die gemeinsame Bestimmung von Kohlenhydraten und Proteinen nur auf mehreren Streifen durchführbar. Auf diese Weise ist eine exakte Zuordnung von Protein- und Kohlenhydrat-Zonen zueinander schwierig, da es kaum gelingt, eine völlig gleiche Wanderung auf parallelen Streifen

zu erzielen. Das Prinzip der Methode besteht darin, für die Proteinfärbung einen Farbstoff zu wählen, dessen Absorptionsmaximum in einem Wellenlängenbereich liegt, in dem die Absorption der Kohlenhydrat-Färbung praktisch zu vernachlässigen ist (s. Abb. 1). Man mißt dann die Proteinfärbung bei einer Wellenlänge, bei der die Kohlenhydrat-Färbung noch keine Absorption zeigt und umgekehrt.

Bei der Überprüfung einiger Anwendungsbeispiele mit dieser Methode fielen bestimmte Eigentümlichkeiten im Verhalten der Kohlenhydrate bei Paraproteinämien auf, so daß hierauf kurz eingegangen wird.

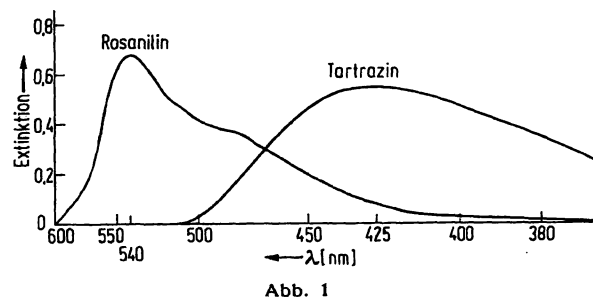


Abb. 1
Absorptionsspektrum der zur Detektion verwandten Farbstoffe
Rosanilin (0,25 mg/100 ml) und Tartrazin (1 mg/100 ml)

Material und Methodik

Reagenzien

1. Perjodsäure 1proz. in dest. Wasser frisch ansetzen,
2. Rosanilinschweflige Säure: 0,5 g Rosanilin in 100 ml heißem dest. Wasser lösen. Nach Abkühlen auf etwa 50° 1 g Natriumhydrogensulfit und 36 ml 1N HCL hinzugeben. Dieses Gemisch

über Nacht stehen lassen, bis es farblos bzw. leicht bräunlich ist. Die Lösung wird farblos gemacht, indem man 0,5–1 g Aktivkohle hinzugibt, umschwenkt und nach 30 Min. abfiltriert. (Diese Lösung ist im Kühlschrank unbeschränkt haltbar!),

3. Bisulfitwasser: 10 g Natriumhydrogensulfit + 1 l dest. Wasser + 6 ml Eisessig,

4. Tartrazin: 0,1proz. in Methanol/0,2N Oxalsäure 1:2 (v/v),

5. Transparenzbad: 100 ml Äthanol + 25 ml Eisessig.

Geräte

Elektrophoresekammer (Shandon), Spektralphotometer mit Densitogrammsatz und Kompensations-Schreiber (C. Zeiss).

Durchführung

Die Serumelektrophorese wird bei pH 8,8 wie in einer früheren Mitteilung beschrieben (7), ausgeführt. Die denaturierten, noch ungefärbten Streifen werden in Benzol, Toluol oder Benzin kurz eingetaucht, um Lipide und freie Fettsäuren in Lösung gehen zu lassen, weil ungesättigte Fettsäuren bzw. Lipide nämlich auch eine PAS-Färbung geben.

Anschließend nach Verdampfen der Flüssigkeit 45 Min. langes Bad in 1proz. Perjodsäure, 10 Min. Auswaschen unter fließendem Leitungswasser. Danach 45 Min. in Rosanilinschwefliger Säure färben, 6 × 10 Min. in Bisulfitwasser waschen und nochmals 60 Min. unter fließendem Leitungswasser wässern. Im Anschluß hieran erfolgt die Proteinfärbung. Der kohlenhydratgefärbte Streifen wird 15 Min. in 0,1proz. Tartrazinlösung gefärbt, Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes in Methanol/Oxalsäure 1:2 (v/v) bis zur Entfärbung des Streifens. Der Streifen kommt kurz in Methanol und wird dann auf eine entsprechende Glasplatte (150 × 30 mm) aufgezogen. Die Transparenz erfolgt nach Transparenzbad von 15–20 Sek. im Trockenschrank bei 60° nach etwa 30 Min.

Anfang und Ende des Elektropherogramms werden mit Markierungsstrichen gekennzeichnet. Im Densitometriezusatz des Spektralphotometers wird zunächst das Densitogramm des Proteinelektropherogramms bei 425 nm ermittelt und nach Drehung des Streifens um 180° erfolgt die spiegelbildliche Aufzeichnung des Densitogramms des Kohlenhydrat-Elektropherogramms bei 540 nm. Protein- und Kohlenhydrat-Aufzeichnung wurden immer bei gleichbleibender Transportgeschwindigkeit von Schreiber und Transportschlitten und derselben Empfindlichkeitsstufe des Photometers vorgenommen.

Ergebnisse

Seren von 25 gesunden Menschen dienten uns zur Untersuchung der Kohlenhydrate und Proteine mit der Serumelektrophorese. Die gefärbten Streifen bieten nebeneinander die mit dem Auge nur schwach zu erkennenden gelb gefärbten Proteinfractionen und die deutlich rot-violett gefärbten Kohlenhydrat-Fractionen. Die photographische Wiedergabe ist aus diesen Gründen unzuverlässig. Die Dokumentation gelingt nur mittels eines Densitogramms.

Abbildung 2 zeigt das typische Verhalten aufgetrennter Kohlenhydrate und Proteine gesunder Normalpersonen. Erwartungsgemäß finden wir den Hauptanteil der Kohlenhydrate in der Region der α - und β -Globuline. Regelmäßig lassen sich fünf Kohlenhydrat-Fractionen darstellen. Es besteht eine exakte Zugehörigkeit der einzelnen Kohlenhydrat-Fractionen zu den bekannten Erhebungen im Proteinelektropherogramm. So lassen sich jeweils im Albumin-, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globulin-Bereich voneinander getrennte korrespondierende Koh-

lenhydrat-Gipfel nachweisen, die im folgenden mit den römischen Ziffern I (Albumin) —V (γ -Globulin) gekennzeichnet werden sollen. Die höchste Erhebung im Kohlenhydrat-Bereich finden wir regelmäßig im Gipfel III (entspricht α_2 -Globulin). Auffallend war bei den untersuchten Seren der relativ hohe Ausschlag in I und eine versetzte Erhebung (V) im γ -Globulin-Bereich. Hier fallen die Gipfelpunkte der Kohlenhydrate und der Proteine nicht genau zusammen.

Die Untersuchung von Seren bei Lebercirrhose (Abb. 3) ergibt in bezug auf die Kohlenhydrate einen dem Proteinelektropherogramm ähnlichen stumpfbogigen Gipfel bzw. ein Plateau in V, das gegenüber dem normalen Vergleichscollectiv deutlich vergrößert ist. Die übrigen Kohlenhydrat-Anteile zeigen in Übereinstimmung die relativen Veränderungen der Serumproteine.

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen je ein kombiniertes Kohlenhydrat- und Proteinelektropherogramm bei Plasmocytom und M. WALDENSTRÖM. Auffälliger Unterschied ist die schmalbasige, deutlich überhöhte Kohlenhydrat-Zacke beim M. WALDENSTRÖM in V, die bei gleichbleibender Empfindlichkeit des Photometers den Proteingipfel im γ -Globulin-Bereich überragt. Außerdem ist diese Zacke auf den γ -Globulin-Bereich beschränkt. Beim Plasmocytom ist je nach immunologischer Differenzierung der Kohlenhydrat-Gipfel unterschiedlich im Globulin-Bereich lokalisiert (Abb. 6) und erreicht zumindest im γ -Globulin-Bereich nicht die Höhe des zugehörigen Proteingipfels (Abb. 4 u. 6).

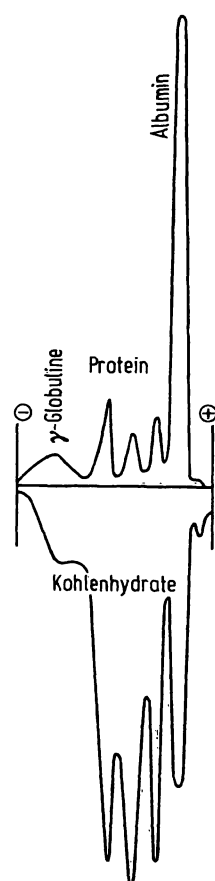


Abb. 2
Protein- und Kohlenhydrat-Densitogramm eines Normalserums

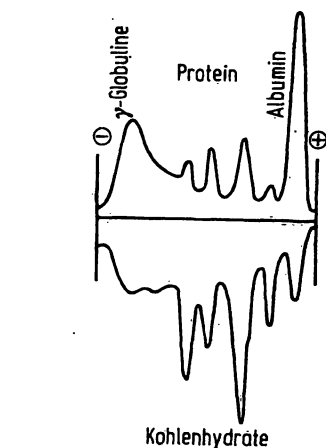


Abb. 3
Protein- und Kohlenhydrat-Densitogramm eines Serums bei Lebercirrhose

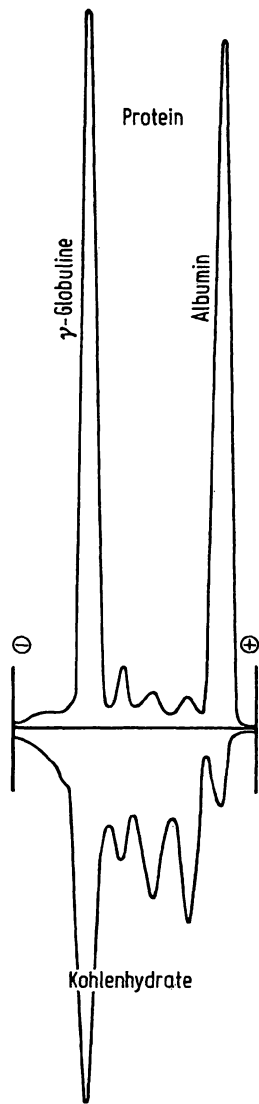


Abb. 4
Protein- und Kohlenhydrat-Densitogramm eines Serums bei Plasmocytom (vgl. auch Abb. 6)

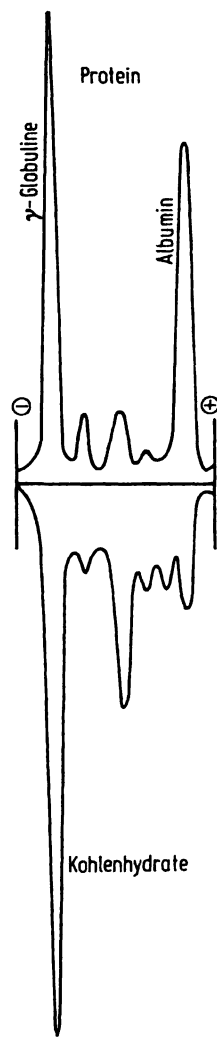


Abb. 5
Protein- und Kohlenhydrat-Densitogramm eines Serums bei M. WALDENSTRÖM

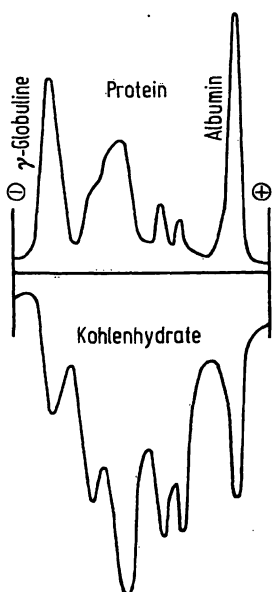


Abb. 6
Protein- und Kohlenhydrat-Densitogramm eines Serums bei Plasmocytom (vgl. auch Abb. 4)

Diskussion

Die hier mitgeteilten Kohlenhydrat-Elektropherogramme von Normalseren sind im Vergleich zu Untersuchungen anderer Autoren (INFANTE (8), WUNDERLY (6), BÖTTIGER (9), SCHEIFFARTH (10)) in guten Einklang zu bringen. Übereinstimmend kann festgestellt werden, daß normalerweise im α_2 - und β -Globulin-Bereich der Kohlenhydrat-Anteil (II) am größten ist. Die Angaben über den Anteil (I) der Glykoproteine im Albumin-Bereich sind sehr unterschiedlich (0,76—15%), während die relative Verteilung der anderen Fraktionen (II—IV) von allen Autoren etwa gleichsinnig angegeben werden. Quantitative Angaben werden nur dann gemacht, wenn durch chemische Hilfsmethoden die einzelnen Kohlenhydrat-Komponenten exakt bestimmt werden können. Der hohe Kohlenhydrat-Anteil in I unserer Diagramme ist zu einem beträchtlichen Teil durch die Trübung von Licht durch gefärbte Albuminmoleküle bedingt. Beim Anfärben gehen die zunächst gleichmäßig in der elektrophoretischen Zone verteilten Proteine in gefärbte Körnchen über, da alle sauren Wollfarbstoffe (Tartrazin, Neucoccin, Pouceau S) Eiweißfällungsmittel sind. Eine Beeinflussung der Kohlenhydrat-Färbung bei der Wellenlänge für die Proteinmessung (425 nm) und umgekehrt konnte nicht festgestellt werden.

Tartrazin und Rosanilin wurden wegen weit auseinander liegender Absorptionsmaxima als Farbstoffe gewählt (s. Abb. 1). Die in der Elektrophorese-Technik üblichen Farbstoffe Pouceau S und Amidoschwarz 10 B scheiden wegen der Lage der Absorptionskurven (13) aus.

Abbildung 1 zeigt, daß die Absorptionsmaxima von Tartrazin und Rosanilin genügend weit auseinander liegen, um eine einwandfreie Messung zu garantieren. Eine wesentliche Beeinflussung der Proteinmessung durch den Kohlenhydrat-Farbstoff, der noch im Absorptionsmaximum von Tartrazin eine geringe Extinktion aufweist, die im Vergleich zur Extinktion im Absorptionsmaximum von Tartrazin nur 14,6% beträgt, kann ausgeschlossen werden.

Bei Vergleich der spezifischen Färbungen auf parallel gelaufenen Streifen wären Versetzungen der Gipfelpunkte gegeneinander, wie sie die Abbildungen 2—5 zeigen, nicht mit Sicherheit auszumachen. Im Unterschied zu diesen Verfahren können mit der hier beschriebenen Methode Proteine und Kohlenhydrate auf einem Streifen beurteilt werden. Dies gewährleistet in jedem Fall, ohne daß man den Risiken bestimmter Techniken des Auftragens von Serum und der Inkonzanz des Spannungsfeldes ausgesetzt ist, eine exakte Aussage über die Zugehörigkeit der Kohlenhydrate zu den Proteinfractionen. Voraussetzung hierfür ist allerdings das einwandfreie und reproduzierbare Verhalten von Papiervorschub und Transportvorrichtung des Densitogrammsatzes. Fehler lassen sich hier aber leicht erkennen, da dann bei Drehung der Glasplatte um 180° die Markierungsstriche am Anfang und Ende des Elektropherogrammes nicht zueinander passen.

Die genaue Kenntnis über die Zugehörigkeit von Glykoprotein-Fractionen zu bestimmten Proteinen war uns besonders wichtig für unseren Beitrag zur „Differentialdiagnose“ M. WALDENSTRÖM/Plasmocytom. Die Zahl der untersuchten Seren von Patienten mit M. WALDENSTRÖM (4) und Plasmocytom (7) ist leider zu klein, um gesicherte Aussagen über das unterschiedliche Verhalten der Glykoproteine zu machen. Wie auch in einem von WUNDERLY und PILLER (6) mitgeteilten Diagramm deutlich sichtbar ist, fiel uns bei den M. WALDENSTRÖM-Seren der hohe, schmale und nur auf den γ -Globulin-Bereich beschränkte Kohlenhydrat-Gipfel auf. Im Gegensatz hierzu konnten die Glykoproteine je nach Art der immunologischen Differenzierung das Plasmocytom in verschiedene Globulin-Bereiche lokalisiert werden. Sie sind nach Form und Höhe des Ausschlages deutlich von den Diagrammen bei M. WALDENSTRÖM unterschiedlich.

Dieses Verhalten ist Ausdruck der unterschiedlichen Zusammensetzung der Glykoproteine bei Paraproteinämien.

So wie die unterschiedlichen Globuline verschiedene Kohlenhydrat-Komponenten besitzen, durch die sie zusätzlich charakterisiert sind, ist auch den Paraproteinen eine bestimmte Kohlenhydrat-Komponente zugehörig. Bei einer ganzen Reihe akuter auch chronisch stationärer Krankheitsfälle sind die Veränderungen im Verhalten der Kohlenhydrate untersucht worden (SEIBERT und Mitarbeiter (11), E. KÖRW und Mitarbeiter (5), HARTMANN und Mitarbeiter (12), WUNDERLY und Mitarbeiter (6) und INFANTE und Mitarbeiter (8). Vergleichende Untersuchungen des Kohlenhydrat-Anteiles klinisch wichtiger Paraproteinämien stehen noch aus.

Es erscheint uns daher sinnvoll, diesen Eigentümlichkeiten des Verhalten der Glykoproteine mehr Beachtung zu schenken und anhand eines größeren Krankengutes zu überprüfen, weil eine Bestätigung unserer Vermutung die Differentialdiagnose der Paraproteinämien vereinfachen könnte.

Literatur

1. MÖRNER, K. A., Zbl. Physiol. 7, 581 (1893). — 2. RIMINGTON, C., Biochem. J. 25, 1062 (1931). — 3. SÖRENSEN, M. und G. HAUGAARD, Biochem. Z. 360, 247 (1933). — 4. TISELIUS, A., Biochem. J. 31, 1464 (1931). — 5. KÖRW, E. und A. GRÖNVALL, Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, 153 (1955). — 6. WUNDERLY, CH. und S. PILLER, Klin. Wschr. 32, 425 (1954). — 7. BUSSE, V. und H.-J. DULCE, diese Z. 7, 486 (1969). — 8. INFANTE, F. und S. GIROD-JUILLARD, Clin. chim. Acta, Amsterdam 11, 424 (1965). —
9. BÖTTIGER, L. E. und L. A. CARLSON, Clin. chim. Acta, Amsterdam 5, 812 (1960). — 10. SCHEIFFARTH, F., G. BERG und H. GÖTZ, Papierelektrophorese in Klinik und Praxis, S. 39; Urban & Schwarzenberg, München-Berlin (1962). — 11. SEIBERT, F. B., M. V. SEIBERT, J. ATNO und H. CAMPBELL, J. clin. Invest. 26, 90 (1947). — 12. HARTMANN, L., S. FILITTI-WURMSER, N. LELIÈVRE-ARDAILLOU und P. BOIVIN, Sang 31, 491 (1960). — 13. BUSSE, V., diese Z. 6, 273 (1968).

Dr. V. Busse
1000 Berlin 19
Spandauer Damm 130